

Hubungan Polimorfisme Gen Laktoferin dengan Kualitas Susu pada Sapi Perah Friesian-Holstein

(Association of Lactoferrin Polymorphism on Milk Yield and Milk Quality in Holstein-Friesian Dairy Cows)

Elmy Mariana¹

¹Fakultas Pertanian, Universitas Syiah Kuala

ABSTRACT The purposes of this study were to identify the polymorphism of the lactoferrin gene and the association of genetic variants of the lactoferrin gene on milk quality in Holstein-Friesian (HF) cows. The study was conducted on 194 heads of HF lactating cows coming from semi intensive of small dairy farmers in two villages of the KPSBU Lembang, Lembang district. Investigation on variant genotypes of the lactoferrin gene used PCR-RFLP method. Genotyping of the lactoferrin gene with *EcoRI* restriction enzyme produced two genotypes, i.e. AA (65%) and AB (35%) genotypes.

Both the AA and AB genotypes had inconsistency in controlling component of the milk quality. Further, the AB lactoferrin cows had a higher frequency in the classification of low somatic cells count (0.75), while the AA cows were at a higher frequency in the classification of high somatic cells count (0.60). It was concluded that there is no strong relationship between intron 6 lactoferrin gene with milk quality parameters. Further, the AB genotype of the lactoferrin gene had a consistency in producing lower somatic cells count compared to the AA genotype.

Key words: polymorphism, lactoferrin gene, milk quality, PCR-RFLP

2011 Agripet : Vol (11) No. 2: 51-57

PENDAHULUAN

Arah seleksi ternak perah adalah untuk menghasilkan sapi-sapi dengan sifat unggul produksi susu yang tinggi, kualitas susu yang baik dan ketahanan terhadap penyakit. Seleksi keunggulan genetik melalui identifikasi gen yang diprediksi berasosiasi kuat dengan produksi, kualitas susu dan ketahanan terhadap penyakit akan sangat mendukung bagi program perbaikan genetik sapi perah domestik. Khususnya, seleksi untuk gen-gen yang mengontrol protein susu dan resistensi terhadap penyakit mastitis (Kaminski *et al.*, 2006; Hagiwara *et al.*, 2003). Mastitis merupakan penyakit yang paling sering menyerang sapi perah dan menyebabkan kerugian ekonomi terbesar pada peternakan sapi perah di dunia. Penurunan produksi dan kualitas susu merupakan penyebab utama kerugian ekonomi karena kasus mastitis, baik mastitis subklinis maupun mastitis klinis. Angka kejadian mastitis di dunia cukup tinggi

yaitu pada kisaran 25 sampai 60% (Schukken *et al.*, 2003).

Laktoferin merupakan komponen protein susu yang berfungsi mengurangi kejadian mastitis (Nibbering *et al.*, 2001), protein tersebut disintesis oleh sel granulosit dan sel epitel kelenjar susu sebagai respon terhadap infeksi misalnya mastitis (Kaminski *et al.*, 2006). Beberapa laporan menyebutkan aktivitas antibakterial laktoferin baik pada penelitian in vitro maupun in vivo (Arnould *et al.*, 2009; Nibbering *et al.*, 2001; Pawlik *et al.*, 2009; Wakabayashi *et al.*, 2006). Laktoferin menyebabkan membran bakteri gram negatif tidak stabil karena terjadi pemblokiran interaksi antara LPS dengan LPS signaling (CD 14) (Rainard and Riollot, 2006). Lebih lanjut Connely (2001) menyatakan bahwa laktoferin merupakan protein multi fungsi seperti membantu penyerapan zat besi di usus, pertumbuhan sel usus, melindungi dari serangan mikroba penyebab infeksi dan sebagai sistem kekebalan tubuh. Protein multifungsi ini merupakan kunci pada kesehatan kelenjar susu sehingga potensial untuk digunakan sebagai kandidat gen pada

Corresponding author: elmy_mariana2002@yahoo.com

seleksi resistensi sapi perah terhadap mastitis (Seyfert *et al.*, 1996; Wojdak-Maksymiec *et al.*, 2006).

Gen laktoferin terletak pada kromosom 22 (22q24). Struktur gen laktoferin terdiri atas 17 exon dan 16 intron. Total basa pada gen laktoferin sapi adalah 13647 pb. Panjang total exon, total intron dan daerah promotor gen laktoferin secara berurutan adalah 2339 pb, 8064 pb dan 1122 bp (Schanbacher *et al.*, 1993; Seyfert *et al.*, 1994). Dari exon 2 sampai 4 dan dari exon 9 sampai 12 mengkodekan domain globular pertama pada masing-masing lobe, sedangkan dari exon 12 sampai 15 mengkodekan globular yang lainnya. Sedangkan asam amino yang membentuk daerah *Hinge* dikodekan pada awal exon 9 (Seyfert *et al.*, 1994).

Telah banyak polimorfisme yang ditemukan pada gen laktoferin baik pada daerah exon, intron maupun daerah UTR (Seyfert *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2004; Kamiński *et al.*, 2006). Lebih lanjut dilaporkan bahwa polimorfisme pada daerah pengaturan memiliki pengaruh pada ekspresi gen. Sequen gen laktoferin dari *Gen Bank* menunjukkan fragmen dimana mutasi terjadi, dimana titik mutasi tersebut dikenali oleh enzim restriksi *EcoRI*. Pada fragmen gen laktoferin lokus *EcoRI* ditemukan dua alel yaitu alel A dan alel B yang mengkodekan tiga kemungkinan genotipe yaitu genotipe AA, AB dan BB (Klussmann and Seyfert, 1995; Seyfert and Kuhn, 1994; Wojdak-Maksymiec *et al.*, 2006). Alel A memiliki frekuensi 0.755 dan alel B 0.245 (Seyfert and Kuhn, 1994). Seyfert and Kühn (1994) mendeteksi adanya 6 polimorfisme pada daerah UTR'5 dan 1 polimorfisme pada exon 1. Li *et al.* (2004) menemukan 6 SNP yang lainnya yaitu: 1 pada exon 4, 1 pada intron 4, 1 pada exon 8, 2 pada exon 9 dan 1 pada exon 15. Polimorfisme pada posisi +32 (G/C) memiliki peranan penting pada determinasi kandungan dan kualitas protein susu, tetapi tidak memiliki hubungan dengan jumlah sel somatik susu (Kamiński *et al.*, 2006). Lebih lanjut Kamiński *et al.* (2006) menyebutkan bahwa alel G berhubungan dengan ekspresi laktoferin yang rendah dan daerah promotor berhubungan erat dengan rendahnya jumlah sel somatik susu, sebaliknya

alel C berkaitan dengan peningkatan kadar laktoferin dalam susu yang menyebabkan system pertahanan tubuh yang lebih baik. Laporan terbaru dari Kaminski *et al.* (2008) menyatakan bahwa kadar protein susu yang lebih tinggi memiliki kaitan yang erat dengan polimorfisme pada posisi +216. Boichard *et al.* (2003) melaporkan adanya hubungan antara polimorfisme pada gen laktoferin dengan kadar lemak susu, sedangkan Ashwell *et al.* (2004) melaporkan mengenai hubungan polimorfisme laktoferin dengan kadar lemak susu dan jumlah sel somatik susu. Harder *et al.* (2006) juga mendeteksi adanya persistensi kadar lemak dan kadar protein susu yang berhubungan dengan gen laktoferin pada sapi perah Holstein di negara Jerman.

Berdasarkan pendekatan yang telah dipaparkan di atas, dimungkinkan untuk melakukan penelitian mengenai hubungan antara polimorfisme gen laktoferin dengan kualitas susu. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi polimorfisme gen laktoferin serta mengetahui konsistensi hubungan antara genotipe gen laktoferin dengan kualitas susu sapi perah Friesian-Holstein (FH) pada peternakan rakyat di bawah binaan KPSBU Lembang.

MATERI DAN METODE

Materi

Sampel darah berasal dari 194 sapi FH laktasi di daerah Lembang. Sampel di kumpulkan dari dua desa yaitu Desa Pasir Kemis (96 ekor) dan Desa Cilumber (98 ekor). Sampel darah diambil dari bagian vena jugularis dengan menggunakan jarum *vaccutainer* no. 21 G dan disimpan dalam tabung *vaccutainer* 10 ml dengan alkohol 96% sebagai preservasi. Sampel susu dikumpulkan untuk pengujian kualitas susu dan jumlah sel somatik (SCC).

Metode

Ekstraksi DNA dan PCR

Isolasi DNA dilakukan dari darah dan dari sel somatik susu. Isolasi DNA dari sampel darah dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi *phenol-chloroform* (Sambrook *et al.* 1989) yang telah dimodifikasi untuk sampel darah yang disimpan dalam alkohol. Isolasi

DNA dari sampel susu dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi DNA dari sel somatik (Arnould *et al.*, 2009).

Proses amplifikasi gen menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan sequen primer mengacu pada Wojdak-Maksymiec (2006). Identifikasi polimorfisme gen laktoferin menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Enzim pemotong (*restriction enzyme*) yang digunakan adalah *EcoRI* dengan situs pengenalan basa G↓AATTC.

Analisis Kualitas Susu

Data kualitas susu yang terdiri atas kadar protein, berat jenis, kadar lemak, kadar bahan kering dan kadar bahan kering tanpa lemak. Prosedur pengujian kualitas susu dilakukan sesuai standart uji pada Dewan Standarisasi Nasional (1998) untuk kualitas susu segar. Pemeriksaan sel somatik susu dengan metode Breed.

Analisis Statistik

Frekuensi alel dan frekuensi genotipe dari masing-masing lokus dihitung berdasarkan persamaan Nei (1987). Data kualitas susu sebelum dianalisis distandarisasi terhadap hari laktasi (1 sampai sampai 6 bulan) dan periode laktasi (1 sampai 5). Pengaruh keragaman genetik terhadap kualitas susu dihitung berdasarkan model linear dari Mattjik dan Sumertawijaya (2006) dan jika respon menunjukkan perbedaan ($\alpha=0,05$) dilakukan pengujian menggunakan metode uji beda tukey.

HASIL DAN PEMBAHASAN

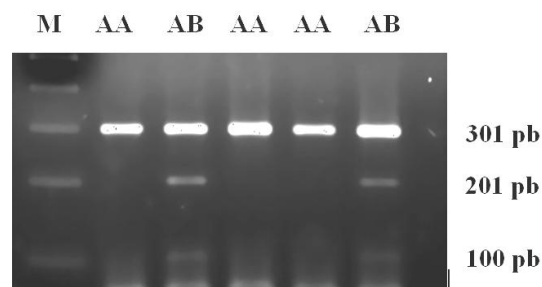
Amplifikasi dan Identifikasi Gen laktoferin

Amplifikasi ruas gen laktoferin dilakukan pada mesin *thermal cycler* (ESCO) dengan suhu *annealing* 60°C. Panjang gen laktoferin yang teramplifikasi dalam penelitian adalah 301 pb sebagaimana panjang ruas DNA yang diapit oleh primer pada sekuen gen laktoferin (nomor akses *gen bank* AH000852S03 dan BOVLACTFER).

Identifikasi keragaman gen laktoferin intron 6 pada sapi perah FH dengan enzim restriksi *EcoRI* mengenali situs pemotongan

G↓AATTC (Seyfert *et al.*, 1994). Pada kerbau keragaman gen laktoferin disebabkan oleh adanya mutasi yang terjadi pada posisi basa ke 3481. Terjadinya mutasi dari C menjadi T menyebabkan sitosin berubah menjadi timin sehingga situs pemotongan untuk enzim restriksi *EcoRI* berubah.

Panjang fragmen produk PCR gen laktoferin adalah 301 pb. Pemotongan gen laktoferin dengan enzim *EcoRI* menghasilkan tiga genotype, yaitu AA, AB dan BB. Alel AA memiliki panjang fragmen 301 (tidak terpotong), alel BB panjang fragmen 100 dan 201. Sedangkan fragmen alel AB merupakan gabungan dari ketiganya (100, 201 dan 301) (Seyfert *et al.*, 1994; Wojdak-Maksymiec, 2006). Hasil penelitian menunjukkan dua genotype, yaitu AA dan AB. Pola pemotongan fragmen genotip laktoferin hasil penelitian ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Visualisasi hasil elektroforesis gen laktoferin produk *EcoRI* pada gel agarose 2%. M adalah Marker 100 bp. AA dan AB adalah varian genotipe gen laktoferin lokus *EcoRI*.

Frekuensi Genotipe dan Frekuensi Alel Gen Laktoferin

Polimorfisme atau keragaman genetik dapat diketahui berdasarkan analisis frekuensi alel dan frekuensi genotipe. Frekuensi genotipe dan frekuensi alel diperoleh dari hasil genotyping 194 sampel. Frekuensi genotipe dan frekuensi alel dari gen laktoferin lokus *EcoRI* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Frekuensi genotipe dan frekuensi alel gen laktoferin pada sapi perah FH.

Lokasi	Jumlah sampel	Frekuensi Genotipe			Frekuensi Alel	
		AA	AB	BB	A	B
Cilumber	98	0.612	0.388	0	0.806	0.194
Pasar Kemis	96	0.737	0.263	0	0.868	0.132
Total	194	0.674	0.326	0	0.837	0.163

Digesti gen laktoferin dengan enzim restriksi *EcoRI* menghasilkan dua alel yaitu alel A dan alel B. Dari tabel dapat dilihat bahwa sapi perah FH yang diteliti memiliki dua genotipe, yaitu genotipe AA (67.4%) dan genotipe AB (32.6%). Pada sapi perah yang diteliti, tidak ditemukan individu yang memiliki genotipe BB. Di antara dua lokasi pengambilan sampel (Cilumber dan Pasar Kemis), frekuensi genotipe AA lebih tinggi dari pada frekuensi genotipe AB. Melalui pengujian X^2 diketahui perbedaan yang signifikan ($P < 0.01$) diantara frekuensi genotipe AA dan AB dikedua lokasi pengambilan sampel. Hasil yang berbeda dilaporkan oleh Sender *et al.* (2006), Wodjak-Maksimiec (2006) dan Zhao *et al.* (2008) yang memperoleh tiga genotipe (AA, AB dan BB) dari hasil pemotongan gen laktoferin lokus *EcoRI* pada sapi perah FH. Lebih lanjut Wodjak-Maksimiec (2006) melaporkan frekuensi genotipe AA, AB and BB secara berurutan adalah 37.90%, 59.68% dan 2.42%. Sender *et al.* (2006) juga melaporkan bahwa frekuensi genotipe BB sangat rendah yaitu 4%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa distribusi diantara alel A dan alel B dikedua lokasi pengambilan sampel bervariasi. Ini menunjukkan bahwa gen laktoferin lokus *EcoRI* pada sapi perah FH bersifat beragam/polimorfis.

Pengaruh Keragaman Genotipe Laktoferin pada Kualitas dan Produksi Susu

Pemeriksaan pengaruh keragaman genotipe gen laktoferin pada kualitas susu dilakukan untuk parameter kadar protein, kadar lemak, BK, BKTL dan BJ. Gambaran kualitas dan produksi susu berdasarkan genotipe AA dan AB gen laktoferin disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Kualitas dan Produksi Susu Berdasarkan Varian Genotipe Laktoferin pada Sapi Perah Fh.

Parameter	Cilumber		Pasar Kemis		Total	
	AA	AB	AA	AB	AA	AB
Protein (%)	2.955 ^a ± 0.356	3.097 ^a ± 0.445	2.947 ^a ± 0.304	2.817 ^a ± 0.327	2.969 ^a ± 0.327	2.980 ^a ± 0.419
Lemak (%)	3.784 ^a ± 0.879	3.563 ^a ± 0.278	3.219 ^a ± 0.764	3.584 ^a ± 0.719	3.473 ^a ± 0.860	3.571 ^a ± 0.667
BK (%)	11.934 ^a ± 1.036	12.350 ^a ± 1.257	11.620 ^a ± 1.179	11.779 ^a ± 0.752	11.761 ^a ± 1.121	12.112 ^a ± 1.100
BKTL (%)	8.287 ^a ± 0.622	8.369 ^a ± 0.341	8.340 ^a ± 0.353	8.123 ^a ± 0.429	8.316 ^a ± 0.489	8.266 ^a ± 0.394
BJ	1.027 ^a ± 0.002	1.027 ^a ± 0.001	1.027 ^a ± 0.001	1.027 ^a ± 0.001	1.027 ^a ± 0.001	1.027 ^a ± 0.001

Keterangan : Superskip yang berbeda pada baris yang sama menyatakan berbeda pada tingkat kepercayaan 95 %.

Dari Tabel 2 dapat kita lihat bahwa nilai rata-rata kadar protein, kadar lemak, BK, BKTL dan BJ, berdasarkan varian genotipe tidak menunjukkan perbedaan, baik pada peternakan rakyat di desa Pasir Kemis, desa Cilumber maupun gabungan kedua desa. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak ada hubungan yang erat antara keragaman pada intron 6 gen laktoferin dengan kualitas susu. Hal ini disebabkan karena sifat kualitas merupakan sifat yang dikendalikan oleh banyak gen (*polygenes*).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa baik genotipe AA maupun AB tidak memiliki konsistensi dalam mengontrol kualitas susu. Arnould *et al.* (2009) yang melakukan penelitian mengenai kontrol gen laktoferin pada populasi sapi perah Belgian Blue, Non-Red Holstein, Holstein, Jersey, Brown Swiss dan Montbeliarde terhadap produksi susu, kadar protein dan kadar lemak melaporkan adanya hubungan yang positif antara polimorfisme pada exon 2, 4, 9, 11, 15 dan intron 8 dengan produksi susu, kadar protein dan kadar lemak. Ng-Kwai-Hang *et al.* (1990) menerangkan bahwa perbedaan pengaruh varian genotipe terhadap sejumlah sifat kualitas susu dapat terjadi dikarenakan perbedaan ukuran populasi, bangsa sapi, frekuensi munculnya varian genotipe yang dipertimbangkan, parameter yang diperiksa (seperti uji per hari, per laktasi, sifat kualitas susu), dan tentunya yang juga penting adalah metode statistik yang dipakai dalam mengelaborasi berbagai faktor seperti pengaruh umur induk, paritas, musim, tahap laktasi, status kesehatan dan variasi genetik itu sendiri.

Pengaruh Keragaman Genotipe Laktoferin pada SCC

Sel somatik merupakan bagian dari kelenjar susu yang terlepas dan terbawa aliran susu pada saat pemerahan susu (Li *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2008). Jumlah sel somatis dalam susu yang dinyatakan sebagai *Somatic Cell Count* (SCC) merupakan indikator terbaik untuk memantau status kesehatan kelenjar susu dan adanya infeksi pada kelenjar susu atau

mastitis (Schukken *et al.*, 2003). SCC secara umum berhubungan dengan kasus mastitis sub klinis ($rg = 0.3-0.7$) (Schukken *et al.*, 2003) dan memiliki nilai heritabilitas yang cukup tinggi ($h^2 = 0.10-0.14$) (Mrode *et al.*, 1998). Hubungan antara varian genotipe gen laktoferin dan jumlah sel somatik susu pada sapi FH ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hubungan Antara Varian Genotipe Laktoferin DAN Jumlah Sel Somatik Susu Sapi Perah Fh

N o	SCC/Kwartir				Rerata	Genotipe
	1	2	3	4		
1	826667	400000	1080000	1000000	826666.67	AB
2	1160000	2440000	660000	4200000	2115000	AA
3	240000	456000	10960000	320000	2994000	AA
4			4280000	260000	2270000	AB
5	920000	3900000	2520000	166666	1876666.5	AB
6	760000	0	160000	840000	440000	AB
7	1440000	880000	0	680000	750000	AB
8	1040000	1080000	3720000	0	1460000	AA
9		800000	1080000		940000	AA
	1178055	1106222	2717777.8	933333.25		

Berdasarkan hasil pengujian diketahui bahwa rata-rata total sel somatik susu bervariasi tetapi semua mempunyai nilai lebih besar dari standar normal berdasarkan syarat mutu susu segar (SNI, 1998) menurut Dewan Standarisasi Nasional (1998) adalah maksimal 400.000/ml. Rata-rata total sel somatik susu hasil penelitian terendah adalah 440.000/ ml.

Tabel 4. Frekuensi Genotipe Gen Laktoferin Berdasarkan Klasifikasi Nilai SCC Tinggi dan Rendah pada Sapi FH

SCC	Jumlah sampel	Genotipe		Frekuensi genotipe		Frekuensi Alel	
		AA	AB	AA	AB	A	B
Tinggi	5	3	2	0.60	0.40	0.800	0.200
Rendah	4	1	3	0.25	0.75	0.625	0.375
Total	9	4	5	0.45	0.55	0.725	0.275

Tabel 4 menunjukkan bahwa sapi FH dengan genotipe AB mempunyai frekuensi yang tinggi pada klasifikasi total sel somatik susu rendah (0.75) dan genotipe AA pada klasifikasi total sel somatik susu tinggi mempunyai frekuensi yang lebih tinggi (0.60). Hasil yang diperoleh mengindikasikan bahwa terdapat hubungan antara genotipe gen

laktoferin lokus *EcoRI* dengan angka sel somatik susu. Pemeriksaan hubungan antara varian genotipe laktoferin dan jumlah sel somatik susu sapi FH menunjukkan bahwa varian genotipe AA pada gen laktoferin memiliki kecenderungan menghasilkan angka sel somatik yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan varian AB. Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian Wodjak-Maksymieck (2006) yang menyatakan bahwa genotipe AB pada laktoferin memberikan nilai SCC susu paling tinggi dan genotipe AA paling rendah. Sender (2006) menyatakan bahwa genotipe AB pada laktoferin memberikan nilai SCC susu tertinggi dan genotipe BB memberikan nilai SCC susu terendah. Karena rendahnya frekuensi genotipe BB, penelitian mengenai polimorfisme gen laktoferin perlu dilanjutkan. Menurut Pawlik *et al.* (2009) perbedaan pengaruh varian genotipe terhadap sifat kualitas susu (SCC) dapat terjadi dikarenakan perbedaan ukuran populasi, frekuensi munculnya varian genotipe yang dipertimbangkan dan variasi genetik itu sendiri.

KESIMPULAN

Genotiping gen laktoferin lokus *EcoRI* menghasilkan dua varian genotipe yaitu AA dan AB dengan frekuensi genotipe AA lebih tinggi (67.4%) dari pada AB (32.6%). Hubungan antara genotipe laktoferin dan kualitas susu sapi FH menunjukkan bahwa baik genotipe AA maupun AB tidak memiliki konsistensi dalam mengontrol kualitas susu. Lebih lanjut, genotipe AB mempunyai frekuensi yang tinggi pada klasifikasi total sel somatik susu rendah (0.75) sedangkan genotipe AA pada klasifikasi total sel somatik susu tinggi (0.60). Kesimpulannya tidak ada hubungan yang erat antara polimorfisme gen laktoferin intron 6 dengan produksi dan kualitas susu, akan tetapi genotipe AB gen laktoferin secara konsisten menghasilkan SCC yang lebih rendah jika dibandingkan dengan genotipe AA.

DAFTAR PUSTAKA

Ashwell, M. S., Heyen, D. W., Sonstegard, T. S., Van Tassel, C. P., Da, Y., Van, P. M., Raden, Ron, M., Weller, J. I., and Lewin, H. A., 2004. Detection of

- quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproduction traits in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 87:468-475.
- Arnould, V. M. R., Soyeurt, H., Gengler, N., Colinet, F. G., Georges, M. V., Bertozzi, C., Portetelle, D., and Renaville, R., 2009. Genetic analysis of lactoferrin content in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 92:2151-2158.
- Boichard, D., Grohs, C., Bourgeois, F., Cerqueira, F., Faugeras, R., Neau, A., Rupp, R., Amigues, Y., Boscher, M. Y., and Levéziel, H., 2003. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* 35:77-101.
- Connely, O. M., 2001. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J. Am. Coll. Nutr.* 20(5):389-395s.
- Dewan Standarisasi Nasional. 1998. SNI 01-2782.1998. Susu Segar. Dewan Standarisasi Nasional, Jakarta.
- Hagiwara, S. I., Kawai, K., Anri, A., and Nagahata, H., 2003. Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *J. Vet. Med. Sci.* 65:319-322.
- Harder, B., Bennewitz, J., Reinsch, N., Thaller, G., Thomsen, H., Kühn, C., Schwerin, M., Erhardt, G., Förster, M., Reinhardt, F., and Kalm, E., 2006. Mapping of quantitative trait loci for lactation persistency traits in German Holstein dairy cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 123:89-96.
- Kamiński S., Malewski, T., Ahman, A., Wójcik, E., Ruś, A., Oleński, K., Jakubczak, A., and Sazanov, A. A., 2008. Towards an integrated approach to study SNPs and expression of candidate genes associated with milk protein biosynthesis. *Russian J. Genet.* 44:459-465.
- Kamiński S., Oleński, K., Brym, P., Malewski, T., and Sazanov, A. A., 2006. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the lactoferrin gene and its associations with milk performance traits in Polish Holstein-Friesian cows. *Russian J. Genet.* 42:924-927.
- Klussmann, U., and Seyfert, H. M., 1995. Genetische Varianten des bovinen Laktoferrins, einem Kandidatengen für Mastitisresistenz. Vortragtagung der DGfZ/GfT, Hannover.
- Li, G. H., Zhang, Y., Sun, D. X., and Li, N., 2004. Study on the polymorphism of bovine lactoferrin gene and its relationship with mastitis. *Anim. Biotech.* 15:67-76.
- Mattjik, A. A., dan Sumertajaya, M., 2006. Perancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab, Jilid 1. IPB Press, Bogor.
- Mrode, R. A., Swanson, G. J. T., and Winters, M. S., 1998. Genetic parameters and evaluations for somatic cell count and its relationship with production and type traits in some dairy breeds in the United Kingdoms. *Anim. Sci.* 66:569-576.
- Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
- Nibbering, P. H. E., Ravensbergen, M. M., Welling, L. A., van Berkel, P., van Berkel, H., Pauwels, K., and Nuijens, J. H., 2001. Human lactoferrin and peptides derived from its N terminus are highly effective against infections with antibiotic-resistant bacteria. *Infect. Immun.* 69 :1469-1476.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., Monardes, H. G., and Hayes, J. F., 1990. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. *J. Dairy Sci.* 73:3414-3420.
- Pawlik, A., Sender, G., and Kossakowska, A. K., 2009. Bovine lactoferrin gene polymorphism and expression in relation to mastitis resistance – a review. *Anim. Sci. Papp. Reprod.* 27:263-271.
- Rainard, P., and Riollot, C., 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37:369-400.
- Sambrook, J., Fritsch, F., and Miniatis, T., 1989. Molecular Cloning Laboratory

- Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schanbacher, F.L., Goodman, R. E., and Tallhouk, R. S., 1993. Bovine mammary lactoferrin : implication from messenger ribonucleic acid (mRNA) sequence and regulation contrary to other milk proteins. *J. Dairy. Sci.* 76:3812-3831.
- Schukken, Y.H., Wilson, D. J., Welcome, F., Garrison-Tikofsky, L., and Gonzalez, R. N., 2003. Monitoring udder health and milk quality using somatic cell counts. *Vet. Res.* 34: 579-596.
- Sender, G., Korwin-Kossakowska, A., Galal, K., and Prusak B., 2006. Ocena wpływu polimorfizmu wybranych genów na występowanie mastitis u krów in polish. *Med. Wet.* 62:563-565.
- Seyfert, H. M., Henke, M., Interthal, H., Klussmann, H., Koczan, D., Natour, S., Pusch, W., Senft, B., Steinhoff, U. M., Tuckoricz, A., and Hobom. G., 1996. Defining candidate genes for mastitis resistance in cattle: The role of lactoferrin and lysozyme. *J. Anim. Breed. Genet.* 113:269-276.
- Seyfert, H. M. and Kuhn, C., 1994. Characterization of a first bovine lactoferrin gene variant, based on an EcoRI polymorphism. *Anim. Gen.* 25:54.
- Seyfert, H. M., Tuckoricz, A., Intertahl, H., Koczan, D., and Hobom, G., 1994. Structure of the bovine lactoferrin-encoding gene and its promoter. *Anim. Genet.* 143:265-269.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., and Takase, M., 2006. Lactoferrin research, technology and applications. *Int. Dairy. J.* 6:1241-1251.
- Wojdak-Maksymiec, K., Kmiec, M., and Ziemak, J., 2006. Associations between bovine lactoferrin gene polymorphism and somatic cell count in milk. *Vet. Med.* 51:14-20.
- Zhao, C. H., He, G. M., Wang, Y. L., and Zhang, Z. X., 2008. Polymorphism analysis of the promoter of cow lactoferrin gene with PCR-RFLP and its correlation with subclinical mastitis. *Acta Agricultur. Slovea.* 92:185-187.